

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-316285

(43)Date of publication of application : 13.11.2001

(51)Int.Cl.

A61K 38/22
A61K 47/42
A61L 27/00
A61P 43/00
C07K 14/495
C07K 14/50
C12N 5/06

(21)Application number : 2000-132205

(71)Applicant : TABATA YASUHIKO
KAKEN PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 01.05.2000

(72)Inventor : TABATA YASUHIKO
INAMOTO TAKASHI

(54) MATERIAL FOR REGENERATION OF TISSUE ORGAN COMPOSED OF CELL AND CELL GROWTH FACTOR**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a material for the regeneration of a tissue organ in vivo.

SOLUTION: The material for the regeneration of a tissue organ in vivo is composed of a cell such as a blast cell, e.g. anaplastic mesenchyme cell, bone marrow cell, peripheral blood stem cell, nerve stem cell, hepatic stem cell (small hepatocyte, oval cell), embryonic stem cell(ES cell), EG cell, muscular satellite cell, osteoblast, odontoblast, chondroblast, epithelial embryonic cell and biliary embryonic cell and a cell growth factor such as basic fibroblast growth factor(bFGF), platelet differentiation growth factor (PDGF), insulin, insulin-like growth factor(IGF), hepatocyte growth factor(HGF), glia-derived neurotrophic factor(GDNF), neurotrophic factor(NF), hormone, cytokine, bone morphogenetic factor (BMP) and transforming growth factor(TGF).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-316285

(P2001-316285A)

(43) 公開日 平成13年11月13日 (2001. 11. 13)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
A 6 1 K 38/22		A 6 1 K 47/42	4 B 0 6 5
47/42		A 6 1 L 27/00	V 4 C 0 7 6
A 6 1 L 27/00		A 6 1 P 43/00	4 C 0 8 1
A 6 1 P 43/00		C 0 7 K 14/495	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/495		14/50	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-132205 (P2000-132205)

(22) 出願日 平成12年5月1日 (2000. 5. 1)

(71) 出願人 599029420

田畑 泰彦

京都府宇治市琵琶台3-8-16

(71) 出願人 000124269

科研製薬株式会社

東京都文京区本駒込2丁目28番8号

(72) 発明者 田畑 泰彦

京都府宇治市琵琶台3-8-16

(72) 発明者 稲本 俊

京都府京都市北区小山西玄以町20-1

(74) 代理人 100078662

弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞と細胞増殖因子とからなる組織器官の再生のための材料

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 組織器官をin vivoで再生させるための材料を供給する。

【解決手段】 未分化間葉系細胞、骨髄細胞、末梢血幹細胞、神経幹細胞、肝幹細胞 (小肝細胞、oval細胞)、胚性幹細胞 (ES細胞)、EG細胞、筋衛星細胞、骨芽、ソウゲ芽、軟骨芽、上皮系胚芽細胞、胆管芽細胞などの芽細胞等の細胞と塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血小板分化増殖因子 (PDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子 (IGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、グリア誘導神経栄養因子 (GDNF)、神経栄養因子 (NF)、ホルモン、サイトカイン、骨形成因子 (BMP)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) 等の細胞増殖因子とからなる組織器官のインビボ再生のための材料を供給する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞と細胞増殖因子とからなる組織器官のインビボ再生のための材料。

【請求項 2】 細胞が未分化間葉系細胞、前駆細胞、又は芽細胞であることを特徴とする、請求項 1 記載の材料。

【請求項 3】 細胞増殖因子が徐放性であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の材料。

【請求項 4】 細胞増殖因子が徐放性担体により徐放化されていることを特徴とする、請求項 3 記載の材料。

【請求項 5】 さらに、足場材料を含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の材料。

【請求項 6】 細胞が脂肪前駆細胞であり、細胞増殖因子が bFGF であり、組織器官が脂肪組織である、請求項 2 記載の材料。

【請求項 7】 細胞が脂肪前駆細胞であり、細胞増殖因子が bFGF であり、徐放性担体が架橋ゼラチンであり、組織器官が脂肪組織である、請求項 4 記載の材料。

【請求項 8】 細胞が脂肪前駆細胞であり、細胞増殖因子が bFGF であり、徐放性担体が架橋ゼラチンであり、足場材料がコラーゲンであり、組織器官が脂肪組織である、請求項 5 記載の材料。

【請求項 9】 細胞が骨髄細胞であり、細胞増殖因子が TGF- β 1 であり、徐放性担体が架橋ゼラチンであり、組織器官が骨組織である、請求項 4 記載の材料。

【請求項 10】 細胞が骨髄細胞であり、細胞増殖因子が TGF- β 1 であり、徐放性担体が架橋ゼラチンであり、足場材料がコラーゲンであり、組織器官が骨組織である、請求項 5 記載の材料。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、細胞と細胞増殖因子とを組み合わせ用いることを特徴とする組織器官の再生のための材料に関する。

【0002】

【従来の技術】 人工臓器を用いた再建医療は、現在、臨床に大きく貢献しているものの、効果が一時的で、侵襲が大きく、補助できる機能が単一であるという大きな欠点がある。一方、移植医療もドナー不足に加えて、移植後の免疫抑制剤の副作用による感染症や発癌なども問題であり、理想的な治療とはいえない。このように現在の先端医療の二本柱がそれぞれに限界に達してきている。このような状況の中で、自己の組織を再生させることによって欠損あるいは荒廃した組織や臓器を復元するという、新しい治療の試みが行われている。これが再生医学である。すなわち、細胞を利用することによって、人為的に自己の組織や臓器を再び健全なものにしようという試みである。

【0003】 ヒトを含む哺乳動物においては、高次に分化した臓器の再生能力は消失していると考えられてき

た。しかしながら、近年、これらの動物でも再生能力をもつのではないかと考えられるようになってきている。つまり、哺乳動物では個体を守るための創傷治癒があまりにも早く進行する結果、臓器再生の場が奪われ、本来もっている再生能力が見失われている。例えば、骨髄移植は古くから行われている治療法でありよい臨床成績をあげている。これは骨髄細胞中の血液幹細胞が増殖分化できる天与の場、骨髄組織が体内に存在しているからこそ成功していると考えられる。つまり、ヒトといえども、個体が生存していくためには、組織、臓器に幹細胞が存在しなければ生存しえないはずであり、生体内に広く存在するであろう幹細胞に対して十分な再生の場を与えることができれば、自己組織を再生させることができる可能性がある。近年、神経系や肝臓などにも幹細胞の存在することがわかってきている。

【0004】 そこで、このような考えのもとに、いろいろな組織再生の方法が研究開発されているが、現在のところ、再生のための足場、細胞増殖因子、および幹細胞の 3 者を組み合わせて利用する方法が最も現実的である。

【0005】 再生場所における幹細胞や前駆細胞の接着・分化・形態形成の促進のためには再生のための足場が必要である。再生場所の生体組織が再生の足場となり得る場合もあるが、再生のための足場として足場マトリックスが必要となる場合もある。生体吸収性材料はこのマトリックスとして用いられている。

【0006】 しかしながら、例えば、再生場所に足場マトリックスを埋め込んでも、再生に必要な幹細胞、前駆細胞、あるいは芽細胞の数が少なかったり、細胞を増殖分化させる生体因子の濃度が低すぎたりすれば、いかにマトリックスが優れていても、望む組織の再生は起こらない。そこで、補充するべきものとしてまず考えられるのは、細胞の増殖あるいは分化のための細胞増殖因子である。

【0007】 一般に、これらの因子の生体内寿命は短く不安定であり、必要な細胞増殖因子を、単に水に溶かして必要部位に注入するだけでは、期待する組織再生効果は得られない。そこで、再生の場における細胞増殖因子の濃度を必要な期間にわたって有効値に保たなければならぬ。例えば、細胞増殖因子を徐放キャリア内に含ませ、再生の場で持続的に放出させる技術である。細胞増殖因子の徐放により、細胞の増殖分化が高まり、自己組織の再生が促される。しかしながら、組織あるいは器官の種類によっては、細胞増殖因子のみでは再生が不十分である場合が多い。

【0008】 乳癌の根治手術として乳房切除術が行われているが、手術後の乳房再建に関する臨床上に満足できる方法はない。そのため、近年、できる限り切除部位を小さくし、乳房の一部を温存する乳房切除術が行われている。しかしながら、もともと乳房の小さな患者あるい

は温存手術が不可能な患者に対しては、その再建は難しい。このような場合、これまでは皮下脂肪あるいは筋肉付皮下脂肪の欠損部への充填が行われてきた。しかしながら、移植された脂肪組織は血管による血流支配をともなっているにもかかわらず時間とともに、吸収され繊維組織に置き換わり、本来の目的を達成できない。一方、シリコーン製の人工乳房の利用も行われているが、その材料の存在がX線撮影時の見にくさ、長期埋込み時の石灰化とカプセル化などの問題を引き起こすことが多い。

【0009】乳房の再建以外にも、例えば、形成外科領域においても、顔面の凹みの補填に対して皮下脂肪が利用されているが、生体内での吸収とその後に生じる組織の繊維化は臨床、問題となっている。

【0010】採取した脂肪組織を単に生体内に埋入するだけでは、埋入された脂肪組織が時間とともに吸収されていくことが多くの動物実験において報告されている

(例えば、Eppley, B.L.等、Plast. Reconstr. Surg., 90巻、p1022、1992、など)。同種同系であっても、移植された組織に対する炎症反応が起こること、また、それらの組織中にある成熟脂肪細胞は、生体内では死滅していく運命にあり、将来的に成熟脂肪細胞へと分化できる前駆細胞が存在しなければ、脂肪組織の新生は期待できないことを示している。

【0011】動物あるいはヒトの脂肪組織からされた脂肪の前駆細胞、あるいは脂肪前駆細胞の細胞株を用いて、脂肪細胞への分化が調べられている。加えて、遺伝子技術の進歩によって、種々の細胞増殖因子が購入できるようになり、それらの因子の脂肪細胞への分化に対する効果も調べられるようになっていく。しかしながら、それらの研究のすべてin vitroで行われており(例えば、Hausman, G.J.等、J.Lipid Res., 21巻、p657、1980、Hauner, H.等、Klin. Wochenschr, 65巻、p803、1987、Butterwith, S.C.等、J. Endocrinology, 137巻、p369、1993、Gregoire, F.M.等、Physiological Review, 78巻、p783、1998、など)、in vivoでの検討はない。

【0012】マウス由来の脂肪前駆細胞の細胞株をヌードマウスの皮下に投与すると、5週後に皮下に脂肪組織が形成されたことが報告されている(Green, H.等、J. CellPhysiol., 101巻、p169、1979)。しかしながら、用いられている脂肪前駆細胞は細胞株であり、自己の前駆細胞の利用およびそれと細胞増殖因子との併用については一切記載されていない。

【0013】マウスのEHS癌細胞が産生する細胞外マトリックス(Matrigel)は基底膜成分を多く含んでおり、これをマウスの皮下へそのまま、あるいは脂肪の前駆細胞の細胞株とともに埋入することによって脂肪組織の形成が認められること、またその再生が細胞増殖因子の添加により増強されることが報告されている(Kawaguchi, N.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95巻、p1062、1998)が、この場合にも、動物より単離した脂肪前

駆細胞の利用については一切記載されていない。

【0014】ヒトの脂肪組織から単離された脂肪の前駆細胞を非分解吸収性の高分子テフロン(登録商標)メッシュの足場に播種した後、in vitroにおける脂肪細胞への分化が調べられている。(Krai, J. G. 等、Plast. Reconstr. Surg., 104巻、p1732、1999)しかしながら、この研究において、それらの細胞と足場との複合体のin vivoへの埋入は行われておらず、またin vivoでの脂肪組織再生についても全く触れられていない。

【0015】ラットの自己脂肪前駆細胞を生体吸収性のポリ乳酸からなるメッシュに播種した後、ラットの皮下に埋入することによって、ラット自己脂肪組織の再生したことが報告されている(C.W. Patrick, et. al. Tissue Engineering, 5(2), 1999)が、この研究では細胞増殖因子の添加効果は調べられておらず、また、その可能性についても一切、議論されていない。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】組織器官の再生をin vivoで行うためには、その組織あるいは器官を構成している細胞が必要であることは疑いない。しかしながら、単に細胞を再生させたい部位に注入するだけで、その場所に組織や器官を再生させることはきわめて難しい。その理由は加えられた細胞がその部位で増殖、分化することがほとんど期待できないからである。生体内で細胞の増殖および分化を積極的に促進させるためには細胞増殖因子の存在が不可欠である。すでに、多くのin vitro実験によって、未分化間葉系細胞、前駆細胞、あるいは芽細胞が適当な細胞増殖因子の存在下でその数を増やし、分化していくことが証明されている。しかし、in vitroとinvivoでは細胞の環境が全く異なっており、in vitroでの結果をin vivoにおいて再現、予測するのは困難である場合が多い。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明者らはin vivoにおける細胞の増殖分化に関する上記の問題点を解決するために鋭意検討した結果、細胞と細胞増殖因子とを組み合わせる用いることによって、in vivoにおける組織器官の再生が極めて有利となることを見出し、本発明を完成した。したがって、本発明は、細胞と細胞増殖因子とを組み合わせる用いることによって、組織器官をin vivoで再生させるための材料を供給する。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明の技術的構成を説明する。本発明で使用される細胞は、特に限定されないが、例えば、未分化間葉系細胞、骨髓細胞、末梢血幹細胞、神経幹細胞、肝幹細胞(小肝細胞、oval細胞)、胚性幹細胞(ES細胞)、EG細胞、筋衛星細胞、骨芽、ソウゲ芽、軟骨芽、上皮系胚芽細胞、胆管芽細胞などの芽細胞である。これらの細胞は、動物、ヒトから採取することにより、又はその採取細胞を培養系にて数を増やした

り、あるいは特定方向への分化を行わせる処理を行うことにより調製することができる。

【0019】本発明に用いる細胞、例えば脂肪前駆細胞の調製、その細胞増殖因子との混合、およびそれらの組織工学材料を用いた脂肪組織の再生は以下の方法によって行うことができる。

【0020】ヒトの皮下脂肪から採取した脂肪組織塊を鉄によってできる限り細かくする。この脂肪組織塊の細片を2mg/ml濃度のコラゲナーゼ溶液中、37℃にて50分間、振とう処理した。この処理の後、メッシュにて

10 濾別、遠心分離を行い細胞を回収した。
【0021】得られた脂肪前駆細胞を37℃、5%の条件下、インキュベーターにて培養し、細胞を増殖させる。細胞を培養液で分散させ、その中に適当な濃度の細胞増殖因子を混合する。得られた複合体を、例えば、ヌードマウスの背部皮下に埋入する。5週間後、埋入部位に脂肪組織の再生が見られる。

【0022】採取する組織塊は、脂肪組織を含む組織であれば、採取する動物の種類、年齢、およびその部位に関係なく、いずれの組織も本発明に用いることができる。20 一般に、免疫拒絶は細胞成分に対する生体反応である。この免疫拒絶を回避する方法として、例えば、自己の脂肪組織から採取された脂肪前駆細胞を用いる方法がある。これによれば免疫反応の問題はクリアできると考えられる。これらの技術は、他の前駆細胞、芽細胞、幹細胞などでも同様であり、本発明において自己の細胞成分を利用することによって、自己の脂肪組織を再生させることもできる。

【0023】本発明に用いる細胞増殖因子としては、特に限定されるものではないが、脂肪前駆細胞の数を増加させる作用をもつものが好ましい。例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血小板分化増殖因子(PDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子(IGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、グリア誘導神経栄養因子(GDNF)、神経栄養因子(NF)、ホルモン、サイトカイン、骨形成因子(BMP)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)などが挙げられる。これらのうち、本発明では、特に、bFGFが望ましい。その濃度は、細胞数 $10^5 \sim 10^8$ 個当たり0.0001~10μg、好ましくは0.001~1μgである。

【0024】本発明に使用されるこれらの細胞増殖因子は、好ましくは適切な徐放用担体に含有させた状態で細胞と混合して用いる。適切な徐放用担体に含有させた状態で使用する場合には、その徐放期間は約1から3週間の範囲がよい。

【0025】細胞増殖因子の徐放用担体としては、生体内で分解吸収されていく性質をもつものが好ましい。例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸との共重合体、ポリε-カプロラクトン、ε-カプロラクトンと乳酸あるいはグリコール酸との共重合体、

ポリクエン酸、ポリリンゴ酸、ポリ-α-シアノアクリレート、ポリ-β-ヒドロキシ酪酸、ポリトリメチレンオキサレート、ポリテトラメチレンオキサレート、ポリオルソエステル、ポリオルソカーボネート、ポリエチレンカーボネート、ポリプロピレンカーボネート、ポリγ-ベンジル-L-グルタメート、ポリγ-メチル-L-グルタメート、ポリ-L-アラニンなどの合成高分子、デンプン、アルギン酸、ヒアルロン酸、キチン、ペクチン酸およびその誘導体などの多糖、あるいはゼラチン、コラーゲン(コラーゲンのタイプおよびその抽出法はいずれでもよい)、アルブミン、フィブリンなどのタンパク質などが挙げられる。これらの材料から細胞増殖因子の徐放用担体を作製できるが、基底膜成分との均一な混合を目的とする場合には、粒子状の担体が好ましい。また、粒子の直径は10~500μm、好ましくは20~100μmである。

【0026】徐放性の調節は、徐放用担体の分解性を調節することにより行なうことができる。分解性の調節は、例えば、担体作製時における架橋度を変えることにより行なうことができる。徐放期間を1~3週間とするには、例えば、担体作製時の架橋剤濃度あるいは反応時間を調節し、含水率を98~94%として、1~3週間で分解吸収される徐放用担体を作製すればよい。

【0027】細胞と細胞増殖因子とからなる組織工学材料の作製条件は、特に限定されるものではないが、例えば、両者を単に混合するだけでもよく、あるいは、緩衝液、生理食塩水、注射用溶媒、あるいはコラーゲン溶液などの液体とともに混合してもよい。用いる細胞の数として10万~500万個が望ましい。さらに、細胞と細胞増殖因子との混合物を生体吸収性材料からなるスポンジ、メッシュ、不織布状成形物などの足場材料内へ注入、あるいはそれらの足場材料と混ぜ合わせた状態で用いることもできる。

【0028】この際に用いる足場材料としては生体吸収性であることが必須であり、非吸収性の場合には組織の再生を物理的に邪魔をするので好ましくない。足場材料の分解吸収性は、組織の再生の邪魔にならないように適当なものを選択して用いる必要がある。足場材料が合成高分子の場合にはその分子量、化学組成により、天然高分子の場合には架橋の程度によりそれらの吸収性はコントロールできる。これらの方法については、公知の方法を用いることができる。

【0029】本発明にて用いられる細胞、細胞増殖因子の注入、混合のために用いられる足場材料としては、生体内で分解吸収されていく性質をもつことが必須であり、例えば、好ましくは上述の細胞増殖因子の徐放用担体に用いられる材料を利用できる。足場材料と徐放性担体は同一の材料を用いてもよいし、異なるものを用いてもよい。その形態としては、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、およびペースト状などがあるが、これら

に限定されるものではない。本発明の細胞と細胞増殖因子との混合物あるいはその足場材料との混合複合物は、皮膚を切開して埋入あるいは注射により注入することで体内へ投入できる。

【0030】

【実施例】以下、実施例をあげて本発明について説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0031】実施例1

乳癌患者の承諾の元、手術時に正常部位の脂肪組織を採取した。この組織を0.05Mリン酸緩衝生理食塩水溶液（PBS（pH7.4））にて洗浄し、付着している血液等を除去した。脂肪組織塊をを外科用ハサミにて約5ミリ角のサイコロ状にカットした後、コラゲナーゼ溶液（2mg/mlコラゲナーゼ20mg/mlウシ血清アルブミンを含む無血清DMEM培地）を加えて約50分間、ウォーターバス付きシェーカー（37℃）で浸透し、脂肪組織をコラゲナーゼ処理した。処理溶液を孔径が250μmのスチールメッシュでろ過し、コラゲナーゼ消化されていない組織片などを取り除いた。ろ液と等分量のMEM199培地（10%仔牛胎児血清FCS）を加え、コラゲナーゼ活性を止めた後、5分間、1000rpmの条件で、細胞懸濁液をで遠心分離することによって脂肪の前駆細胞を沈渣として得た。上清を捨て、新しいMEM199培地（10%FCS）を加えて、ピペッティングによって細胞を良く分散させた後、75cm²の培養フラスコに播種した（1×10⁵個/mlの細胞密度、15ml）。

【0032】単離した脂肪前駆細胞をフラスコに播種した24時間後、フラスコ底面に付着していない赤血球や未接着の細胞などを培地とともに取り除き、次に、0.1μg/ml濃度のbFGFを含む10%FCSMEM199培地をフラスコに加え、培養を続けた。bFGF含有培地を加えた直後の細胞の状態を図1（A）に示す。約10日間培養を続けると細胞はコンフルエント状態（図1（B））になる。この細胞に10mMのデキサメサゾンを加えると、培養2週間後、細胞は脂肪滴を貯めるように成熟脂肪細胞に分化した（図1（C））。このことは、単離された細胞が脂肪前駆細胞であることを示している。

【0033】実施例2

1000ml容の丸底フラスコにオリーブ油375mlを加え、固定した攪拌用モーター（新東科学社製、スリーワンモーター）にテフロン製攪拌用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した。オリーブ油を30℃、420rpmにて攪拌しながら等電点4.9のアルカリ処理ゼラチン（新田ゼラチン社製）の水溶液（10wt%、10ml）を滴下し、W/O型エマルジョンを調製した。10分間の攪拌後、フラスコを10～20℃に冷却し、さらに、30分間攪拌した。エマルジョンへ100mlのアセトンを加え、さらに1時間攪拌した後、遠心分離（50

00rpm、4℃、5分間）によりゼラチン粒子を回収した。アセトンさらに2-プロパノールを用いて粒子を遠心洗浄することによって、未架橋のゼラチン粒子を得た。得られた未架橋ゼラチン粒子（500mg）を0.01wt%濃度のグルタルアルデヒドを含む、0.1wt%Tween 80の水溶液（100ml）に懸濁させ、4℃、15時間緩やかに攪拌することによってゼラチンの架橋反応を行った。その後、粒子を0.1wt%Tween 80の水溶液、2-プロパノール、蒸留水で2回ずつ洗浄した後、凍結乾燥した。2-プロパノールからの風乾時あるいはPBS中、37℃での平衡膨潤時における粒子の直径を、それぞれ100個粒子について顕微鏡にて測定し、膨潤状態の粒子の体積に対する粒子に含まれる水の体積の比として含水率を算出したところ、その含水率は約95vol%であった。また、膨潤時における粒子の平均粒径は40μmであった。

【0034】¹²⁵Iにより標識した後、この含水率95%の粒子をマウス皮下に投与したところ、投与部位での放射活性は時間とともに減少した。その放射活性は14日後にゼロとなった。次に、bFGFを¹²⁵Iにより標識し、ゼラチン粒子に含浸した後、上記と同様にin vivo投与して、放射活性の時間的変化を調べたところ、その放射活性の残存の時間依存性は粒子の場合とほぼ同じであった。このように、この粒子の分解とともにbFGFはin vivoで徐放化された。この粒子からのbFGFの徐放化期間は14日であった。

【0035】実施例3

実施例1にて調製したコンフルエント状態のヒト脂肪前駆細胞をPBSでよくリンスした後、0.25%トリプシン溶液を加え、5分間インキュベーションすることによって細胞を剥がした。新しい培地を加えて遠心分離し、ヘモサイトメーターで細胞数を計数した。実施例2にて作製した凍結乾燥ゼラチン粒子（2mg）に0μgおよび10μgのbFGF（科研製薬株式会社より供与）を含む水溶液10μlを滴下、25℃で1時間放置することによってbFGFを粒子内に含浸させた。その後、100μlのPBSを加えbFGF含浸ゼラチン粒子を分散させた。1×10⁵の細胞を含む懸濁液100μlと粒子懸濁液とをよく混合した後、約1cm角、3ミリ厚にカットしたタイプIコラーゲンスポンジ（グンゼ（株）より提供）内に注射器にて注意深く注入した。このスポンジを37℃インキュベーター内で1時間放置し細胞をスポンジ内に定着させた。コントロールとして、細胞のみを注入したコラーゲンスポンジを作製した。このようにして得られたコラーゲンスポンジをヌードマウスの背部皮下の脂肪組織のない部位に埋入した。約5週間後皮膚を剥離し、新生した脂肪組織を取り出して組織切片を作製し、HE染色、ズダンIII染色などによって組織学的評価を行った。

【0036】埋入5週間後、背部の皮膚を剥がし、埋入

部位を観察したところ、 $10\mu\text{g}$ のbFGFを含浸したゼラチン粒子と細胞とを含むコラーゲンスポンジを埋入したグループにおいてのみ、肉眼的に脂肪組織の再生が認められた(図2(A))。空のゼラチン粒子と細胞(図2(B))、細胞のみをスポンジに入れたもの(図2(C))ではそのような現象は見られなかった。

【0037】実施例4

実施例3と同様の方法で、投与量の異なる(0.01、0.1及び $10\mu\text{g}$)bFGF含浸ゼラチン粒子あるいは空の粒子と細胞とを注入したコラーゲンスポンジをマウス背部皮下に埋入し、5週間後の脂肪組織再生を組織切片より評価した。再生組織の組織切片を中性脂肪を染めるズダンIIIによって染色した(図3及び4)。図3は、(1)細胞のみを注入したコラーゲンスポンジ、(2)細胞と空のゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ、(3)細胞と $0.01\mu\text{g}$ のbFGFを含浸したゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ、(4)細胞と $0.1\mu\text{g}$ のbFGFを含浸したゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ、図4は、(1)細胞と $1\mu\text{g}$ のbFGFを含浸したゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ、(2)細胞と $10\mu\text{g}$ のbFGFを含浸したゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジを埋入した場合の組織切片の顕微鏡写真である。図4で、(3)は(1)の拡大写真、(4)は(2)の拡大写真である。

【0038】その結果、bFGF含浸粒子のbFGF投与量が1および $10\mu\text{g}$ の場合に、脂肪組織の形成が認められた。脂肪細胞に特有な球形の空洞とその対応した場所がズダンによってオレンジ色に染まっていた。それ以外の実験グループでは脂肪細胞は認められなかった。

【0039】実施例5

実施例2にて作製した 2mg の凍結乾燥ゼラチン粒子に $0.05\mu\text{g}$ のTGF- $\beta 1$ (Sigma Chemicalより購入)を含む水溶液 $10\mu\text{l}$ を滴下、 25°C で1時間放置することによってTGF- $\beta 1$ を粒子内に含浸させた。ウサギを麻酔下、デンタルドリルで大腿骨に直径 2mm の穴を開け 1ml のPBSを注入した。その後、PBSを回収し、フレッシュなPBSにより遠心洗浄し、ウサギ骨髓細胞を調製した。 1×10^6 のウサギ骨髓細胞を含む懸濁液 $100\mu\text{l}$ とTGF- $\beta 1$ 含浸ゼラチン粒子とをよく混合した。ネブタールで全身麻酔した日本白色兔(オス、 $2\sim 2.5\text{kg}$)の頭部を、バリカンで剃毛した後、イソジンで消毒し、キシロカインで局所麻酔をかけた。頭頂部の皮膚を正中切開し、骨膜を剥離、切開した。露出した頭蓋骨頭頂部を生理食塩水をかけ冷却しつつ、デンタルドリルで直径 6mm の骨欠損孔(硬膜は保存)を矢状縫合の左右対称に1つずつ作製した。この骨欠損部へTGF- $\beta 1$ 含浸ゼラチン粒子と骨髓細胞との混合物を挿入し、骨膜を4-0ナイロン糸で、皮膚を2-0絹糸でそれぞれ縫合した。なお、コントロールとし

て、PBSのみ、TGF- $\beta 1$ を含浸していない空のゼラチン粒子と 1×10^6 あるいは 1×10^7 のウサギ骨髓細胞との混合物、 $0.05\mu\text{g}$ のTGF- $\beta 1$ を含浸したゼラチン粒子のみを用いた。術後6週間で、ネブタールにより麻酔死させ、欠損部を含む骨を切り出した。取り出した骨試料を軟X線撮影した。次にホルマリンによる固定、脱灰を行い、組織切片をヘマトキシリン-エオジン染色した後、光学顕微鏡にて観察した。図5は、骨欠損部の組織切片写真である。図5の(A)はPBS処理群、(B)はTGF- $\beta 1$ を含まないゼラチン粒子と骨髓細胞(10^6 個/骨欠損)との混合物処理群、

(C)はTGF- $\beta 1$ を含まないゼラチン粒子と骨髓細胞(10^7 個/骨欠損)との混合物処理群、(D)はTGF- $\beta 1$ 含有ゼラチン粒子($0.05\mu\text{g}$ TGF- $\beta 1$ /骨欠損)処理群、(E)はTGF- $\beta 1$ 含有ゼラチン粒子($0.05\mu\text{g}$ TGF- $\beta 1$ /骨欠損)と骨髓細胞(10^6 個/骨欠損)との混合物処理群を示す。

【0040】図5から、TGF- $\beta 1$ 含浸ゼラチン粒子と骨髓細胞との混合物処理群の骨欠損部においてのみ、骨欠損部が再生した骨組織によって修復されていることが明らかとなった。その他のコントロール実験群では、このような骨再生は見られず、骨欠損部には軟組織の侵入が見られた。これらの結果は、骨髓細胞と細胞増殖因子との混合が組織の再生に不可欠であることを示している。

【0041】足場材料としてコラーゲンスポンジを用いて同様に処理することによっても同じ効果が奏された。

【0042】

【発明の効果】本発明によれば、細胞と細胞増殖因子とを組み合わせることで、組織器官をin vivoで再生させる材料を得ることができる。また、本発明では、用いる細胞として自己組織からの細胞を用いることで免疫拒絶の問題も解消され、自己の組織器官の再生も可能であり、その医療への利用性は非常に大きいといえる。

【図面の簡単な説明】

【図1】脂肪組織塊より単離、培養されたヒト脂肪前駆細胞の光学顕微鏡写真である。

(A) 単離直後の細胞

(B) bFGF添加により増殖した細胞

(C) デキサメサゾン添加により成熟脂肪細胞へと分化した細胞

【図2】ヒト脂肪前駆細胞とbFGF含浸ゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジをヌードマウスの背部皮下に埋入した5週間後の埋入部位の光学顕微鏡写真である。

(A) 細胞と $10\mu\text{g}$ のbFGFを含浸したゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ

(B) 細胞と空のゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ

(C) 細胞のみを注入したコラーゲンスポンジ

【図3】ヒト脂肪前駆細胞とbFGF含浸ゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジをヌードマウスの背部皮下に埋入した5週間後の埋入部位の組織切片(中性脂肪を染めるズダンIII染色)の顕微鏡写真である。

(1) 細胞のみを注入したコラーゲンスポンジ

(2) 細胞と空のゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ

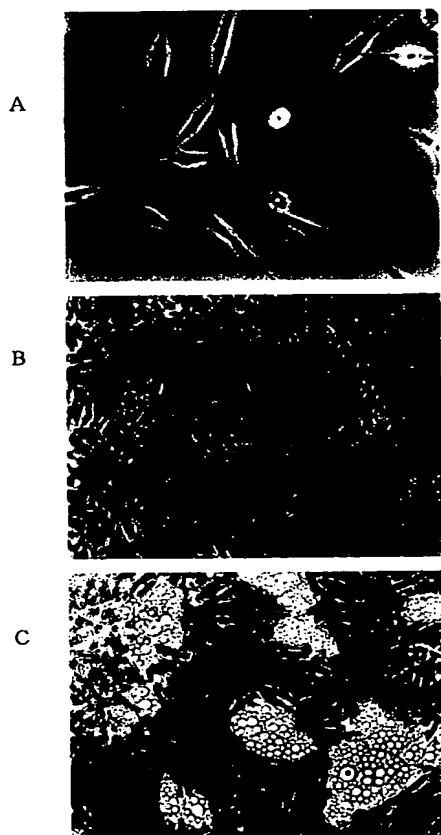
(3) 細胞と0.01 μ gのbFGFを含浸したゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ

(4) 細胞と0.1 μ gのbFGFを含浸したゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ

【図4】ヒト脂肪前駆細胞とbFGF含浸ゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジをヌードマウスの背部皮下に埋入した5週間後の埋入部位の組織切片(中性脂肪を染めるズダンIII染色)の顕微鏡写真である。

(1) 細胞と1 μ gのbFGFを含浸したゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ

【図1】



(2) 細胞と10 μ gのbFGFを含浸したゼラチン粒子とを注入したコラーゲンスポンジ

(3) (1)の拡大写真

(4) (2)の拡大写真

【図5】TGF- β 1含浸ゼラチン粒子と骨髓細胞との混合物をウサギ頭蓋骨欠損部に埋入した後の欠損部の組織切片の顕微鏡写真である。

(A) PBS処理群

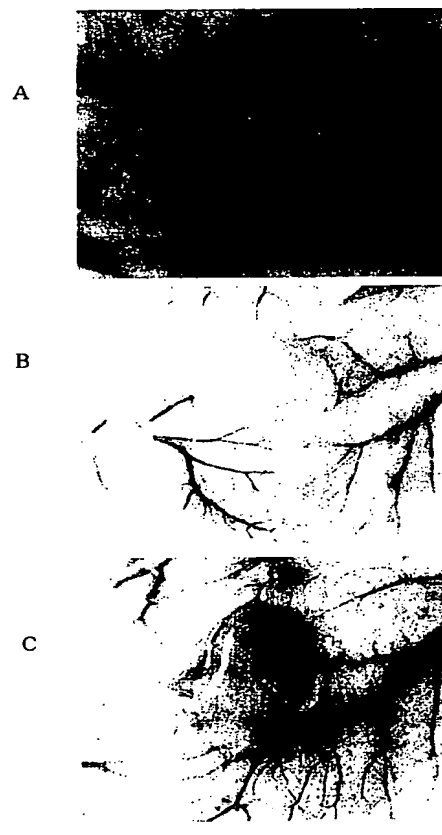
(B) TGF- β 1を含まないゼラチン粒子と骨髓細胞(10⁶個/骨欠損)との混合物処理群

(C) TGF- β 1を含まないゼラチン粒子と骨髓細胞(10⁷個/骨欠損)との混合物処理群

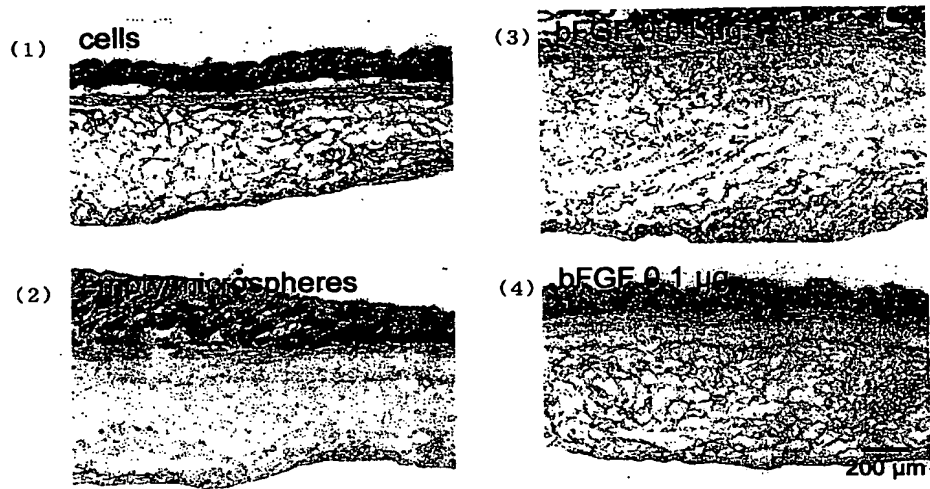
(D) TGF- β 1含有ゼラチン粒子(0.05 μ g TGF- β 1/骨欠損)処理群

(E) TGF- β 1含有ゼラチン粒子(0.05 μ g TGF- β 1/骨欠損)と骨髓細胞(10⁶個/骨欠損)との混合物処理群

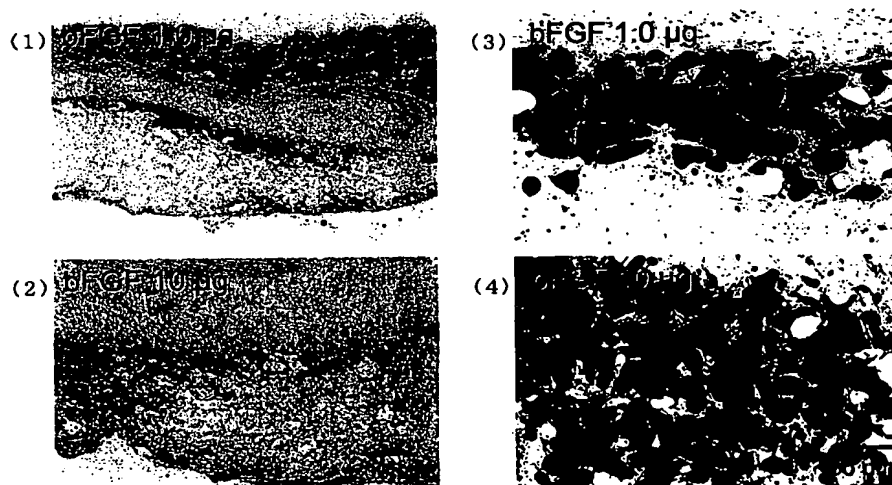
【図2】



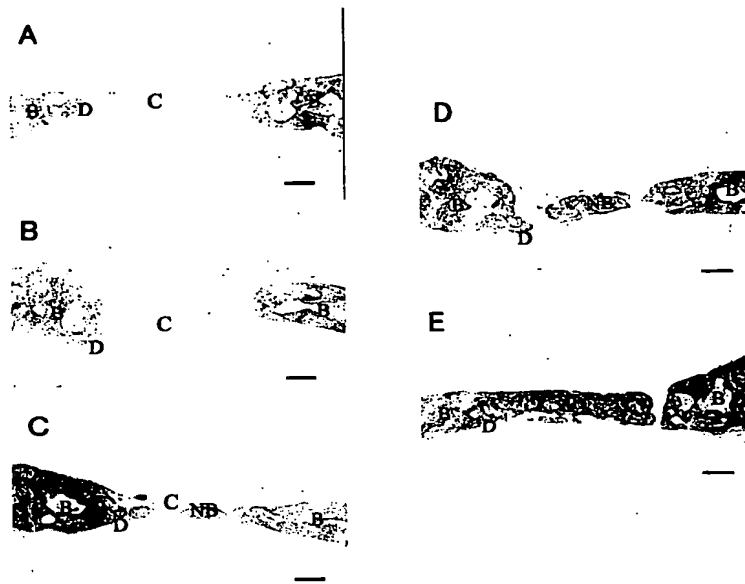
【図 3】



【図 4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

C 0 7 K 14/50

C 1 2 N 5/06

識別記号

F I

A 6 1 K 37/24

C 1 2 N 5/00

テーマコード(参考)

E

Fターム(参考) 4B065 AA90X BB19 BB23 BB34
CA44
4C076 AA76 CC30 EE42 FF32
4C081 AB11 CD29 CD34
4C084 AA01 AA02 BA01 BA44 DA01
DB52 DB54 DB55 DB58 DB62
MA01 MA05 NA14 ZB222
ZC032
4H045 AA10 BA10 CA40 DA22 EA28
EA34 FA71